

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-203956

(43) 公開日 平成7年(1995)8月8日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/06				
C 0 7 D 243/08	5 0 5			
295/14		A		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	E

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平5-5571

(22) 出願日 平成5年(1993)1月18日

(71) 出願人 590005081
株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原2025-5

(71) 出願人 390014535
新技術事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 柳 楽 和彦
熊本県熊本市健軍町3008

(72) 発明者 村上 浩紀
福岡県福岡市東区名島4-16-16

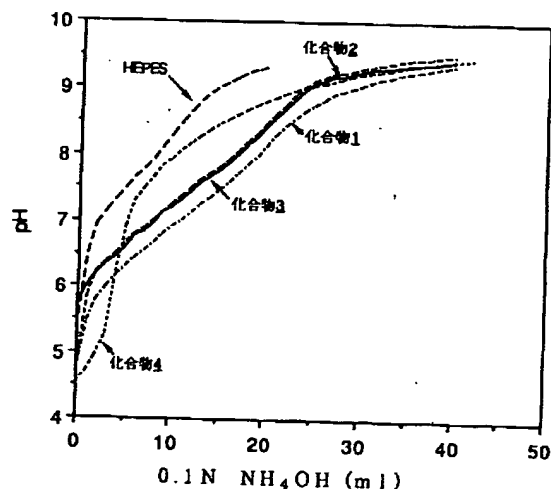
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 ビス(環状ジアミン)化合物

(57) 【要約】

【構成】 pH緩衝剤として細胞培養等に有用な、次式で表わされる新規ビス(環状ジアミン)化合物

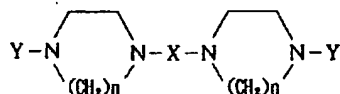
【化1】 (式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシル基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基を、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシアルキル基、もしくはアルコキシアルキル基を示す)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式

【化1】



(式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシル基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシアリル基もしくはアルコキシアリル基を示す)で表わされるビス(環状ジアミン)化合物またはそのアルカリ金属塩もしくはアンモニウム塩。

【請求項2】 請求項1の化合物またはその塩からなるpH緩衝剤。

【請求項3】 請求項2のpH緩衝剤を用いる細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、新規なビス(環状アミン)化合物に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、動物細胞培養のpH緩衝剤等として有用なビス(環状アミン)化合物に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】 従来より、動物細胞を培養して、インシュリン、インターフェロン、成長ホルモン、抗体などの生理活性物質を生産する試みがなされている。このような動物細胞を培養する際には、培地に、アミノ酸、ビタミン類や無機物を添加するとともに、細胞が生存できるpHを維持するためにpH緩衝剤を添加している。このpH緩衝剤としては、種々の血清やグッドpH緩衝剤のひとつである、2-(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸(以下HEPESと略記する)が広く用いられている。

【0003】 しかしながら、血清を用いる場合には、血清の品質に差異があり、安定な細胞培養が困難であることや、血清由来のタンパク質の高分子混合物から、目的とする生理活性物質を分離精製するには多くの費用と労力を必要とすることなどの問題があった。また上記のHEPESの細胞毒性は強く、添加量に制限があるため、pH緩衝作用が長期間にわたって持続できないという問題もあった。

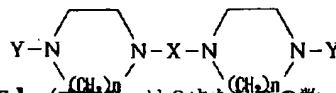
【0004】 そこで、この発明は、上記の従来技術の問題点を解決するためになされたものであって、細胞毒性が低く、pH緩衝作用が強く、かつ生理活性物質の分離精製に悪影響を及ぼさないpH緩衝剤を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題を解決するものとして、次の一般式

【0006】

【化2】



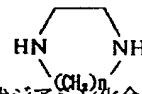
【0007】 (式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシル基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシアリル基もしくはアルコキシアリル基を示す)で表わされるビス(環状ジアミン)化合物またはそのアルカリ金属塩もしくはアンモニウム塩を提供する。

【0008】 そして、また、この発明は、上記化合物をpH緩衝剤とすることや、この緩衝剤を細胞培養に用いる方法をも提供する。すなわち、この発明の前記化合物は、たとえば動物細胞培養のpH緩衝剤や生理活性物質の産生量を増加させる添加剤として非常に有効であって、特異なビス(環状ジアミン)構造を有し、カルボン酸、スルホン酸、硫酸エステル基を結合していることを特徴としている。

【0009】 このうちのカルボン酸またはスルホン酸基を有する化合物については、その製造に際し、まず、次式

【0010】

【化3】

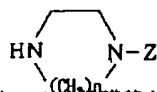


【0011】 の環状ジアミン化合物を原料とし、この環状ジアミン化合物の1個のアミノ基に保護基を導入する。環状ジアミン化合物としては、ピペラジンやホモピペラジンなどがその例として挙げられる。また、保護基としては、たとえば、p-トルエンシルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アセチル基、ホルミル基、ベンジル基などが挙げられる。これらの保護基の酸無水物、酸ハロゲン化物、またはハロゲン化ベンジル等の保護基導入試薬を環状ジアミン化合物と反応させ、環状ジアミン化合物の1個のアミノ基が保護された環状ジアミン誘導体を合成する。

【0012】 次に、上記方法によって合成した保護基を有する次式

【0013】

【化4】

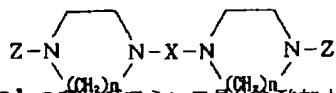


【0014】(式中のZは保護基を示している)の環状ジアミン化合物に、アルキルジハロゲン化物、ヒドロキシアルキルジハロゲン化物、アルコキシアルキルジハロゲン化物もしくはオキシアルキルジハロゲン化物を塩基の存在下で反応させるか、またはアルキルジグリシジルエーテル化合物、またはオキシアルキルジグリシジルエーテル化合物等を反応させ、ピペラジン誘導体の未保護のアミノ基を三級化し、2個のアミノ基が保護された環状ジアミン二量体を合成する。たとえばアルキルジハロゲン化物としては、1, 2-ジクロロエタン、1, 2-ジブromエタン、1, 2-ジヨードエタン、1, 4-ジブromプロパン、1, 6-ジブromヘキサン、1, 8-ジヨードオクタン、1, 3-ジブrom-2, 2-ジメチルプロパンなどが挙げられる。オキシアルキルジハロゲン化物としては、2, 2'-ジクロロエチルエーテル、2, 2'-ジブromエチルエーテル、2, 2'-ジヨードエチルエーテル、エチレングリコールビス(2-クロロエチル)エーテルなどが挙げられる。アルキルジグリシジルエーテル化合物としては、エチレングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、テトラメチレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチレングリコールジグリシジルエーテル、1, 6-ヘキサンジオールジグリシジルエーテルなどが挙げられる。オキシアルキルジグリシジルエーテル化合物としては、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、トリエチレングリコールジグリシジルエーテル、テトラエチレングリコールジグリシジルエーテル、ジブropレングリコールジグリシジルエーテルなどが挙げられる。

【0015】このようにして得られた次式

【0016】

【化5】



【0017】の環状ジアミン二量体を酸加水分解、アルカリ加水分解、または水素化分解して保護基(Z)を除去する。そして、さらに、ハロアルキルカルボン酸、またはアルケンカルボン酸もしくはこれらのヒドロキシ基、アルコキシ基置換カルボン酸をアルカリ金属塩とし、これらと環状ジアミン二量体とを反応し、ついで、イオン交換樹脂、または電気透析により脱塩し、脱保護した環状ジアミン二量体の二級アミノ基にアルキルカルボン酸基等を導入した化合物の遊離酸を得る。たとえばこの場合のハロアルキルカルボン酸としては、モノクロル酢酸、モノブrom酢酸、3-ブromプロピオン酸、4-ブrom酪酸、2-ブrom酪酸などが挙げられる。アル

ケンカルボン酸としては、アクリル酸、メタクリル酸などが挙げられる。

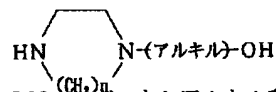
【0018】一方、スルホン酸基を導入する場合には、脱保護基処理した環状ジアミン二量体にハロアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩、アルキレンスルホン酸のアルカリ金属塩、またはアルキルスルトンを反応させ、ついで、必要に応じイオン交換樹脂、または電気透析により脱塩し、脱保護した環状ジアミン二量体の二級アミノ基にアルキルスルホン酸基等を導入した化合物の遊離酸を得る。

【0019】たとえばこの場合のハロアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩としては、2-ブromエタンスルホン酸ナトリウム、3-クロルー2-ヒドロキシプロパンスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。アルキレンスルホン酸のアルカリ金属塩としては、ビニルスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。アルキルスルトンとしては、プロパンスルトン、ブタンスルトンなどが挙げられる。

【0020】また、この発明化合物のうちで、硫酸モノエステル基を有する化合物を製造する場合には、まず、次式

【0021】

【化6】



【0022】のN-ヒドロキシアルキル環状ジアミン化合物等を、前記と同様にアルキルジハロゲン化物等と反応させ、その二量体を合成し、さらにクロルスルホン酸と反応させて硫酸モノエステルを合成する。たとえば以上のようにして製造した遊離の酸は、水に溶解した後に、アルカリ金属塩、またはアンモニウム塩とした陽イオン交換樹脂カラムに通し、イオン交換し、本発明化合物のアルカリ金属塩、またはアンモニウム塩を合成する。

【0023】これらの酸もしくはその塩からなるこの発明の化合物は、優れたpH緩衝剤として利用されるものである。たとえば、同一モル濃度ではpH1単位を増加させるのに、前述の従来公知の化合物であるHEPESに比べ、約2倍のアルカリ量が必要であった。すなわち、この発明の化合物は通常用いられているHEPESに比べ、より多量の酸やアルカリを加えても、pHの変動が少ないという優れたpH緩衝作用を示す。

【0024】実際、この発明の化合物を用いて、動物細胞の培養を行なったところ、生存細胞数はHEPESに比べ増加する傾向を示し、さらには、抗体の産生量もHEPESに比べ増加する傾向を示した。そこで、この発明の化合物は、動物等の細胞培養に有効に使用されるものである。たとえば具体的には、この発明の化合物を動物細胞培養用培地に添加して、HEPESを15mM添

加した培地と同様の生存細胞数とするには、培地に、この発明の化合物を2.5 mMから100 mMの濃度で、望ましくは、5 mMから75 mM添加すればよい。

【0025】この際の動物細胞としては、白血球繊維芽細胞、リンパ芽細胞、ヒーラ(Hela)細胞、Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞、Baby Hamster Kidney (BHK)細胞、などの動物細胞、およびColon carcinoma、ナマルバ細胞、ヒトメラノーマ細胞などのヒト由来の腫瘍細胞を用いることができる。また、種々のミエローマと正常脾臓細胞(B-リンパ球など)が融合して生成するハイブリドーマ細胞ならびに二種のミエローマが融合して生成するハイブリッド細胞を用いることができる。

【0026】ハイブリドーマ細胞としては、HB4C5、AE6F4、AD2、HF10B4、SU-1、SPS-6、MCB-1、MB-4などが挙げられる。ハイブリッド細胞としては、MPC11×W279.1、MPC11×W279.2、MPC11×W273.1a、MPC11×W231-2などが挙げられる。

【0027】これらのハイブリドーマ細胞およびハイブリッド細胞は、組織培養7(2)、55-59、1981に記載の方法で製造することができ、またそれらはソーキンズチツト(Salk Institute(La Jolla California))に保存され、求めに応じ入手可能である。動物細胞培養のための基礎培地として、一般の動物細胞の培養に持ちいられるものであればいかなるものも用いることができる。具体的に好適な基礎培地としては、Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEと略記する)、F-12、PRMI-1640、Eagle培地(これらは「組織培養」、朝倉書店(1981第5刷)、中井準之助ら編集、7~24頁に記載されている)、E-RDF(極東製薬工業社製)などの合成培地が挙げられる。また、これらの基礎培地にインシュリン($2\sim10\mu\text{g}/\text{ml}$)、トランスフェリン($10\sim35\mu\text{g}/\text{ml}$)、セレンウム($1\times10^{-10}\sim1\times10^{-8}\text{M}$)、ビルビン酸($0.5\sim5\text{mM}$)、テミジン($1\times10^{-7}\sim1\times10^{-5}\text{M}$)、ヒポキサンチン($1\times10^{-6}\sim1\times10^{-4}\text{M}$)、エタノールアミン($1\times10^{-6}\sim1\times10^{-4}\text{M}$)などを添加した培地も基礎培地として用いることができる。また、これらの基礎培地に、EGF、FGFなどの動物細胞成長促進因子や血清アルブミンなどを添加してもよい。

【0028】このように、この発明化合物は優れたpH緩衝作用を示す以外にも、生理活性物質の生産量を高める作用を有している。たとえば、ハイブリドーマHB4C5細胞によるIgMの生産の際に、HEPESの代りにこの発明の化合物を加えれば、HEPESを添加した培地よりも優れた結果をえることができる。そのためには、たとえばIgMの生産のためには、本発明化合物を2.5 mMから100 mMの濃度で、望ましくは、5

mMから75 mM添加すればよい。

【0029】以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明化合物の合成方法、及びこの発明化合物を用いた動物培養方法について説明する。もちろん、この発明は、その要旨を越えない限り、以下の実施例に制約されるものではない。なお、以下の実施例では、 ^1H -NMRはブルカー社製AC200核磁気共鳴装置で、テトラメチルシラン基準、または3-(トリメチルシリル)-プロパンスルホン酸ナトリウム基準で測定した。質量分析(以下MSと略記する)は日本電子社製JMX-AX505Wを用い高速原子衝撃法(以下FABと略記する)で測定した。

【0030】

【実施例】

実施例1

1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(2-スルホエチル)ピペラジノ)エタン(化合物1)の合成
<A> N-tert-ブトキシカルボニルピペラジンの合成

ピペラジン40.0 g (456 mmol)を純水400 mlに溶解し、濃塩酸を加えて、pH7に調製した後、アセトン400 mlを加えた。この溶液に二炭酸ジtert-ブチル101 g (465 mmol)を滴下した後、1時間攪拌を続けた。攪拌終了後、アセトンを減圧留去し、残渣中の固形物をろ別した。ろ液に10%水酸化ナトリウム200 mlを加え、pH10に調製した後、150 mlのクロロホルムで4回抽出した。このクロロホルム抽出液を150 mlの純水で3回洗浄した。洗浄後のクロロホルム抽出液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去した後、残渣を五酸化リン上で減圧乾燥し、目的化合物を50.1 g得た。収率58%白色ワックス状物 ^1H -NMR (CDCl_3 , δ ppm) 1.46 (s, 9H) 1.68 (s, 1H) 2.81 (t, J=4.9 Hz, 4H) 3.38 (t, J=4.9 Hz, 4H) MS (FAB positive) M+1=187

 1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(tert-ブトキシカルボニル)ピペラジノ)エタンの合成

N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン30.0 g (161 mmol)と1, 2-ジブromエタン14.1 g (75.0 mmol)をアセトニトリル180 mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム17.1 g (204 mmol)を加えた後、24時間、加熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルム200 mlと純水300 mlを加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層を100 mlのクロロホルムで3回抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、50 mlの純水で3回洗浄

した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し得られた残渣を150mlのアセトニトリルから再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥し、目的化合物26.6gを得た。収率89% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.42 (t $J=5.0\text{Hz}$ 8H) 2.53 (s 4H) 3.42 (t $J=5.0\text{Hz}$ 8H) MS (FAB positive) $M+1=399$

<C> 1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタンの合成

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ-tert-ブトキシカルボニル) ピペラジノ) エタン 25.0g (62.8mmol) に純水200mlと47%臭化水素酸水溶液225gを加え、3時間加熱還流した。加熱還流後、減圧濃縮し、残渣を五酸化リン、および水酸化カリウム上で減圧乾燥し、目的化合物の4臭化水素酸塩を39.4g得た。収率120%

この目的化合物の4臭化水素酸塩39.4gを30%水酸化ナトリウム水溶液50mlに溶解した後、減圧濃縮し残渣を100mlのクロロホルムで5回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣を五酸化リン上で減圧乾燥した。減圧乾燥後、純水300mlに溶解し、活性炭0.5gを加え脱色した後、活性炭を除いて減圧濃縮し、得られた残渣を90mlの純水から再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物9.7gを得た。収率78% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.67 (s 2H) 2.45 (t $J=4.8\text{Hz}$ 8H) 2.51 (s 4H) 2.89 (t J

$=4.8\text{Hz}$ 8H) MS (FAB positive) $M+1=199$


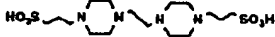
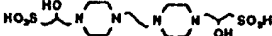
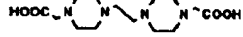
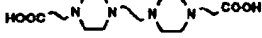
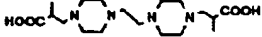
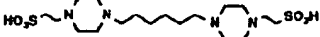

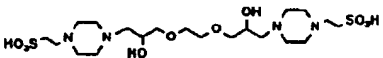
<D> 1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ-2-スルホエチル) ピペラジノ) エタンの合成

1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン8.45g (42.7mmol) を純水150mlに溶解し、ビニルスルホン酸ナトリウム25%水溶液54.7g (105mmol) を加えた後、24時間加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 400mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のビニルスルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80mlまで減圧濃縮し、活性炭1.5gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を40mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調製した後、メタノール250mlを加え、生成した結晶をろ取し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物12.9gを得た。収率73% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $M-1=413$

この化合物1の元素分析値は、化合物2~9とともに表1に示した。

【0031】

【表1】

化合物	元素分析値 (%)
 化合物 1	計算値 C=40.56 H=7.29 N=13.52 実測値 C=40.41 H=7.27 N=13.44
 化合物 2	計算値 C=43.42 H=7.74 N=12.66 実測値 C=43.48 H=7.70 N=12.78
 化合物 3	計算値 C=40.49 H=7.22 N=11.81 実測値 C=40.58 H=7.32 N=11.76
 化合物 4	計算値 C=53.49 H=8.34 N=17.82 実測値 C=53.39 H=8.30 N=17.88
 化合物 5	計算値 C=56.12 H=8.83 N=16.36 実測値 C=56.04 H=8.90 N=16.30
 化合物 6	計算値 C=58.35 H=9.25 N=15.12 実測値 C=58.40 H=9.18 N=15.21
 化合物 7	計算値 C=45.94 H=8.14 N=11.90 実測値 C=46.00 H=8.09 N=11.83
 化合物 8	計算値 C=41.91 H=7.47 N=12.22 実測値 C=41.85 H=7.61 N=12.31
 化合物 9	計算値 C=42.69 H=7.52 N=12.66 実測値 C=42.56 H=7.61 N=12.70

【0032】実施例2

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (3-スルホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物2) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.50g (7.58 mmol) を脱水メタノール25mlに溶解し、プロパンスルトン2.07g (17.0 mmol) を加えた後、60℃で24時間加熱した。加熱終了後、生成した結晶をろ取り、純水10mlに溶解し、活性炭0.05gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を5mlまで減圧濃縮し、メタノール30mlを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物2.45gを得た。収率73% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 1.83-2.05 (m 4H) 2.07-2.85 (m 24H) 2.9

1 (t J=7.7 Hz 4H) MS (FAB negative) M-1=441

実施例3

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物3) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53 mmol) を純水45mlに溶解し60℃に加熱した。この溶液に、3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸ナトリウム2.95g (15.0 mmol) を純水40mlに溶解した溶液を30分間滴下した後、1.5時間で70℃まで昇温した。次に、この溶液に、水酸化ナトリウム0.6g (15.0 mmol) を純水40mlに溶解した溶液を30分間で滴下したのち、80℃で18.5時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、

濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応の3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させ、この溶出液を20mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を10mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調整した後、エタノール150mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物1.42gを得た。収率40% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.15-2.94 (m 24H) 3.02-3.06 (m 4H) 4.23-4.37 (m 2H) MS (FAB negative) $M-1=473$

実施例4

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (カルボキシメチル) ピペラジノ) エタン (化合物4) の合成
モノブrom酢酸2.64g (19.0mmol) を純水10mlに5~10℃で溶解した溶液に水酸化カリウム1.40g (25.0mmol) を純水10mlに溶解した溶液を滴下し、中和した。この溶液を5℃から20℃まで昇温しながら、実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53mmol) を純水30mlに溶解した溶液を、2時間で滴下した。次に、この溶液を20℃から30℃まで昇温しながら、水酸化カリウム1.24g (22.1mmol) を純水35mlに溶解した溶液を2時間で滴下した。次に、この溶液を30℃から50℃まで2時間で昇温した後、50℃で8時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 75ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のモノブrom酢酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を60mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコール800mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥した後、純水4mlから再結晶して、目的化合物0.89gを得た。収率38% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.54 (s 4H) 3.00 (s 20H) MS (FAB negative) $M-1=313$

実施例5

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-カルボキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物5) の

合成

実施例1<D>に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53mmol) とアクリル酸ナトリウム1.69g (18.0mmol) を純水50mlに溶解し、24時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 70ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のアクリル酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭で脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコールを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥した後、純水から再結晶して目的化合物1.33gを得た。収率52% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.36 (t $J=7.3\text{Hz}$ 4H) 2.43-2.96 (m 24H) MS (FAB negative) $M-1=341$

同様にして、メタクリル酸ナトリウムを用いて反応させ、1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-カルボキシプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物6) を得た。表1にその元素分析値を示した。

実施例6

1, 6-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホノエチル) ピペラジノ) ヘキサノ (化合物7) の合成

<A> 1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ピペラジノ) ヘキサノの合成

実施例1に示した合成法と同様の操作で反応した。N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン4.65g (25.0mmol) と1, 6-ジブromヘキサン2.44g (10.0mmol) をアセトニトリル100mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム2.94g (35.0mmol) を加えた後、24時間、加熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物2.90gを得た。収率64% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.25-1.37 (m 4H) 1.38-1.58 (m 22H) 2.28-2.39 (m 12H) 3.43

(t J=4.9 Hz 8H) MS (FAB positive) $M+1=455$

 1, 6-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) ヘキサン (化合物7) の合成

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ピペラジノ) ヘキサン 2.82 g (6.21 mmol) に純水 40 ml と 4.7% 臭化水素酸水溶液 26 g を加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、 $^1\text{H-NMR}$ で tert-ブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

【0033】この濃縮残渣に純水 30 ml と水酸化ナトリウム 1.49 g (37.3 mmol) を純水 30 ml に溶解した溶液を加え、次に、ピニルスルホン酸ナトリウム 25% 水溶液 8.10 g (15.6 mmol) を加えた後、20 時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 75 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のピニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 40 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.25 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 20 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調製した後、メタノール 100 ml を加え、生成した結晶をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 2.15 g を得た。収率 74% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 1.30 (s 4H) 1.47 (s 4H) 2.05-3.03 (m 24H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $M-1=469$

実施例 7

2, 2'-ビス (N'-2-スルホエチルピペラジノ) エチルエーテル (化合物8) の合成

<A> 2, 2'-ビス (N'-tert-ブトキシカルボニルピペラジノ) エチルエーテルの合成

N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン 9.30 g (50.0 mmol) と 2, 2'-ジクロロエチルエーテル 28.6 g (20.0 mmol) をアセトニトリル 200 ml に溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 5.88 g (70.0 mmol) を加えた後、24 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 3.54 g を得た。収率 40% 白色ワックス状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.40-2.58 (m 12H) 3.38 (t J=5.0 Hz 8H) 3.46 (t J=5.4 Hz 4H) MS (FAB positive) $M+1=443$

 2, 2'-ビス (N'-2-スルホエチルピペラジノ) エチルエーテル (化合物8) の合成

2, 2'-ビス (N'-tert-ブトキシカルボニルピペラジノ) エチルエーテル 3.32 g (7.51 mmol) をジオキサン 20 ml に溶解し、これに飽和塩酸ジオキサン溶液 40 ml を加え、1 時間静置した。生成した沈澱をろ取り、エチルエーテルで洗浄した後、五酸化リン上で減圧乾燥して、2, 2'-ジピペラジノエチルエーテル 4 塩酸塩 2.62 g を得た。収率 90% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.41-2.71 (m 12H) 2.84 (t J=5.4 Hz 8H) 3.61 (t J=6.4 Hz 4H) MS (FAB positive) $M+1-4\text{HCl}=243$

さらにまた、この 2, 2'-ジピペラジノエチルエーテル 4 塩酸塩 2.50 g (6.44 mmol) を純水 30 ml に溶解し、水酸化ナトリウム 1.42 g (35.5 mmol) を純水 30 ml に溶解した溶液を加え、次に、ピニルスルホン酸ナトリウム 25% 水溶液 8.25 g (15.9 mmol) を加えた後、20 時間加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 80 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のピニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 40 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.25 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 20 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調製した。これに純水 400 ml を加え、電気透析装置 (旭化成社製 マイクロアシライザー G3 分離膜 AC-110-400) を用いて脱塩した後、減圧濃縮し、残渣を五酸化リン上で減圧乾燥して、目的の化合物 8 2.15 g を得た。収率 73% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.15-3.00 (m 24H) 3.07-3.15 (m 4H) 3.63 (t J=6.5 Hz 4H) MS (FAB negative) $M-1=457$

実施例 8

エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3- (N'-2-スルホエチルピペラジノ) プロピル) エーテル (化合物9) の合成

<A> エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3- (N'-tert-ブトキシカルボニルピペラジノ) プロピル) エーテルの合成

N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン 7.51 g (40.4 mmol) とエチレングリコール ジグリシジルエーテル 3.12 g (17.9 mmol) をクロロホルム 40 ml に溶解し、24 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ取り、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシ

リカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 8.61 g を得た。収率 91% 透明オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.30–2.61 (m 12H) 3.45–3.54 (m 16H) 3.67 (s 2H) 3.72–3.98 (m 2H) MS (FAB positive) $M+1=547$

 エチレングリコール ジ(2-ヒドロキシ-3-(N'-tert-ブトキシカルボニルピペラジノ)プロピル)エーテル (化合物 9) の合成

エチレングリコール ジ(2-ヒドロキシ-3-(N'-tert-ブトキシカルボニルピペラジノ)プロピル)エーテル 8.19 g (15.0 mmol) をジオキサン 40 ml に溶解し、これに飽和塩酸ジオキサン溶液を 80 ml を加え、1 時間静置した。生成した沈澱をろ取り、エチルエーテルで洗浄した後、五酸化リン上で減圧乾燥して、エチレングリコール ジ(2-ヒドロキシ-3-ピペラジノプロピル)エーテル 4 塩酸塩 7.01 g を得た。収率 95% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.43–2.58 (m 12H) 2.81 (t $J=5.0\text{ Hz}$ 8H) 3.46 (m 4H) 3.71 (s 4H) 4.00–4.10 (m 2H) MS (FAB positive) $M+1=447$

エチレングリコール ジ(2-ヒドロキシ-3-ピペラジノプロピル)エーテル 4 塩酸塩 6.93 g (14.1 mmol) を純水 40 ml に溶解し、水酸化ナトリウム 3.33 g (83.3 mmol) を純水 20 ml に溶解した溶液を加え、次に、ピニルスルホン酸ナトリウム 25% 水溶液 18.9 g (36.3 mmol) を加えた後、18 時間加熱還流した。加熱還流後、反応液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 180 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のピニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 80 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.5 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 60 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調製した。これに純水 400 ml を加え、電気透析装置 (旭化成社製 マイクロアシライザー G3 分離膜 AC-110-400) を用いて脱塩した後、減圧濃縮し、残渣を五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 6.09 g を得た。収率 77% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.32–2.89 (m 24H) 3.07–3.15 (m 4H) 3.41–3.60 (m 4H) 3.69 (s 4H) 4.00–4.10 (m 2H) MS (FAB negative) $M-1=561$

実施例 9

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ホモピペラジノ) エタン (化合物 10) の合成

<A> N-tert-ブトキシカルボニルホモピペラジンの合成

実施例 1 <A> に示した合成法と同様の操作で反応した。ホモピペラジン 11.6 g (116 mmol) を純水に溶解し、濃塩酸を加えて、pH 7 に調製した後、アセトンを加えた。この溶液に二炭酸ジ-tert-ブチル 5.4 g (117 mmol) を滴下した後、1 時間攪拌を続けた。攪拌終了後、アセトンを減圧留去し、残渣中の固形物をろ別した。ろ液に水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH 10 に調製した後、クロロホルムで抽出した。このクロロホルム抽出液を純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム抽出液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムを除き、クロロホルムを減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物を 13.9 g 得た。収率 60% 無色オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 9H) 1.64 (s 1H) 1.69–1.85 (m 2H) 2.82–2.93 (m 4H) 3.38–3.52 (m 4H) MS (FAB positive) $M+1=201$

 1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ホモピペラジノ) エタンの合成

実施例 1 に示した合成法と同様の操作で反応した。N-tert-ブトキシカルボニルホモピペラジン 8.00 g (40.0 mmol) と 1, 2-ジブロムエタン 3.54 g (18.8 mmol) をアセトニトリルに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 4.20 g (50.0 mmol) を加えた後、24 時間加熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムを除き、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 14.5 g を得た。収率 85% 無色オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 1.72–1.85 (m 4H) 2.62–2.75 (m 12H) 3.38–3.49 (m 8H) MS (FAB positive) $M+1=427$

<C> 1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ホモピペラジノ) エタン (化合物 10) の合成

実施例6に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ホモピペラジノ) エタン 4.26 g (10.0 mmol) に純水40 mlと47%臭化水素酸水溶液30 gを加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、¹H-NMRでtert-ブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

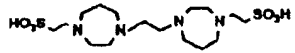
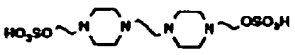
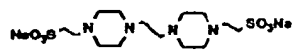
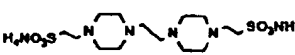
【0034】この濃縮残渣に純水20 mlと水酸化ナトリウム2.40 g (60.0 mmol)を純水40 mlに溶解した溶液を加え、次に、ビニルスルホン酸ナトリウム25%水溶液12.1 g (23.3 mmol)を加えた後、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 150 mlを詰めたカラムを通して、反応生成物を吸着させ、さ

らに純水をカラムを通して洗浄し、未反応のビニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N水酸化アンモニウム水溶液をカラムを通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調整した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物3.14 gを得た。収率71% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 1.73-1.80 (m 4H) 2.51-3.01 (m 24H) 3.05-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) M-1=441

この化合物の元素分析値は、次の表2に、化合物11~13とともに示した。

【0035】

【表2】

化合物	元素分析値 (%)
 化合物 10	計算値 C=43.42 H=7.74 N=21.89 実測値 C=43.52 H=7.80 N=21.60
 化合物 11	計算値 C=37.66 H=6.77 N=12.55 実測値 C=37.60 H=6.81 N=12.64
 化合物 12	計算値 C=36.68 H=6.16 N=12.22 実測値 C=36.58 H=6.22 N=12.31
 化合物 13	計算値 C=35.28 H=7.61 N=23.51 実測値 C=35.22 H=7.70 N=23.61

【0036】実施例10

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物11) の合成

<A> 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ピペラジノ) エタンの合成
 ピペラジンエタノール15.6 g (120 mmol)と1, 2-ジブロムエタン9.27 g (49.3 mmol)をアセトニトリル50 mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム12.8 g (152 mmol)を加えた後、20時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣を50 mlのクロロホルムで4回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物3.00 gを得た。収率21% 白色結晶物 ¹H-NMR (CDCl₃ δ ppm) 2.

3.8-2.73 (m 24H) 3.00 (s 2H) 3.61 (t J=5.4 Hz 4H) MS (FAB positive) M+1=287

 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物11) の合成

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ピペラジノ) エタン2.00 g (6.99 mmol)を20 mlのジメチルスルホキシドに溶解し、氷浴で冷却した。この溶液にクロルスルホン酸2.04 g (17.5 mmol)を30 mlのジメチルスルホキシドに溶解した溶液を滴下した。滴下終了後、室温で2時間攪拌した。攪拌終了後、氷浴で冷却しながら、純水50 mlを滴下し、過剰のクロルスルホン酸を分解し、次に、25%アンモニア水溶液を滴下し中和した。この溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を希塩酸で再生した陽

イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 150mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調製した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物1.06gを得た。収率34% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.07-2.94 (m 24H) . 3.58 (t J=6.4Hz 4H) MS (FAB negative) $\text{M}-1=445$

実施例11

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン2ナトリウム塩 (化合物12) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン3.12g (7.54mmol) を純水20mlに溶解した。この溶液を10%塩化ナトリウム水溶液でナトリウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100mlを詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にエタノール250mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物3.12gを得た。収率90% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $\text{M}-\text{Na}=435$

実施例12

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン2アンモニウム塩 (化合物13) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン3.21g (7.75mmol) を純水20mlに溶解した。この溶液を10%塩化アンモニウム水溶液でアンモニウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100mlを詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にイソプロパノール250mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物3.00g

を得た。収率86% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $\text{M}+1-2\text{NH}_4=413$

実施例13

化合物1、2、3及び4の滴定

化合物1、2、3及び4を1mmol秤取り、純水100mlに溶解した。溶液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、pHメーター (堀場製作所製 pHメーター F-1 pH電極6366-10D) でpHを測定しながら、0.1Nアンモニア水溶液で滴定した。0.1Nアンモニア水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。この発明の優れたpH緩衝効果が認められる。

比較例1

HEPESの滴定

実施例13に示した方法と同様な操作で滴定した。HEPESを1mmol秤取り、純水100mlに溶解し、0.1Nアンモニア水溶液で滴定した。0.1Nアンモニア水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。

実施例14

化合物1から13を用いた動物細胞培養

ハイブリドーマHB4C5細胞 (1×10^5 細胞/ml) を、HEPESを含まない極東E-RDF培地 (極東製薬工業社製) にITES培地 (インシュリン $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタノールアミン $20 \mu\text{M}$ 、亜セレン酸ナトリウム 20mM いずれも最終濃度) を添加した培地 (以下、ITES-ERDF培地と略記する) に、化合物1から13を15mMの濃度となるように添加した培地で、ハイブリドーマHB4C5細胞を37℃で5%炭酸ガスインキュベータ中で4日間培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養液を遠心分離 ($500 \times g$ 5分間) して得られた培養上清中の抗体 (1gM) 量をELISA法で定量した。その結果を次の表3に示した。

【0037】この発明の化合物には抗体産生の増大効果が認められる。

比較例2

同様にしてHEPESについても定量し、その結果も表3に示した。

【0038】

【表3】

化合物	生存細胞数 (細胞/ml)	抗体 (IgM) 量 (ng/ml)
実施例 13		
化合物 1	6.1×10^5	91.0
化合物 2	5.0×10^5	42.5
化合物 3	4.9×10^5	41.8
化合物 4	5.1×10^5	40.7
化合物 5	4.9×10^5	40.3
化合物 6	4.8×10^5	49.9
化合物 7	4.6×10^5	43.8
化合物 8	4.6×10^5	41.5
化合物 9	4.7×10^5	40.4
化合物 10	4.7×10^5	42.1
化合物 11	5.7×10^5	44.1
化合物 12	5.9×10^5	89.4
化合物 13	6.0×10^5	88.6
比較例 2		
HEPES	4.7×10^5	40.5

【0039】実施例 14

ITES-ERDF培地に、化合物 1 を 2.5 mM から 100 mM の濃度で添加し、実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンプルー法で測定した。また、培養上清中の抗体 (IgM) 量を ELISA 法で定量した。結果を表 4 に示した。

比較例 3

ITES-ERDF培地に、HEPES を 5 mM から 50 mM の濃度で添加し、実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンプルー法で測定した。また、培養上清中の抗体 (IgM) 量を ELISA 法で定量した。その結果も表 4 に示した。

【0040】

【表 4】

化合物	添加濃度 (mM)	生存細胞数 (細胞/ml)	抗体 (IgM) 量 (ng/ml)
実施例 14			
化合物 1	2.5	5.3×10^5	71.0
	5.0	5.5×10^5	75.6
	7.5	5.8×10^5	80.0
	15.0	6.1×10^5	91.0
	30.0	5.6×10^5	61.8
	60.0	4.1×10^5	52.9
	75.0	3.1×10^5	34.1
	100.0	2.7×10^5	31.0
比較例 3			
HEPES	5.0	3.3×10^5	32.0
	10.0	3.6×10^5	32.4
	15.0	4.7×10^5	40.5
	20.0	4.5×10^5	48.6
	30.0	4.0×10^5	32.6
	40.0	3.2×10^5	28.7
	50.0	3.0×10^5	32.0

【0041】実施例 15

ITES-ERDF培地に、化合物 1 を 15 mM の濃度で添加し、第 5 表に記載のハイブリドーマ細胞、ヒトメ

ラノーマ細胞、ヒーラ細胞を実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンプルー法で測定した。結果を表 5 に示した。

比較例 4

ITES-ERDF培地に、HEPESを15mMの濃度で添加し、実施例13と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。その結果も表

5に示した。

【0042】

【表5】

細胞	実施例13 生存細胞数 (細胞/ml)	比較例4 生存細胞数 (細胞/ml)
ハイブリドーマ細胞		
AE6F4	2.9×10^5	2.7×10^5
AD2	5.0×10^5	4.5×10^5
HF10B4	2.0×10^5	1.9×10^5
SU-1	5.3×10^5	4.6×10^5
ヒトメラノーマ細胞	3.8×10^5	3.5×10^5
ヒーラ細胞	4.8×10^5	4.3×10^5

【0043】

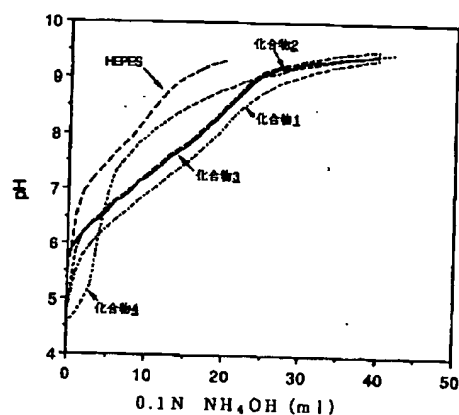
【発明の効果】この発明によって、pH緩衝剤、細胞培養へのその利用、さらには抗体産生の増大等の点に優れた効果が得られる新規ビス（環状アミン）化合物が提供

される。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明化合物のアンモニア水溶液による滴定曲線を例示した図である。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成6年3月8日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】実施例2

1, 2-N, N'-ビス（N'', N'''-ジ（3-スルホプロピル）ピペラジノ）エタン（化合物2）の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス（ピペラジノ）エタン1.50g（7.58mmol）を脱水メタノール25mlに溶解し、プロパ

ンスルトン2.07g（17.0mmol）を加えた後、60℃で24時間加熱した。加熱終了後、生成した結晶をろ取し、純水10mlに溶解し、活性炭0.05gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を5mlまで減圧濃縮し、メタノール30mlを加え、生成した結晶をろ取し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物2.45gを得た。収率73% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 1.83-2.05 (m 4H) 2.07-2.85 (m 24H) 2.91 (t $J=7.7\text{Hz}$ 4H) MS (FAB negative) $M-1=441$

実施例3

1, 2-N, N'-ビス（N'', N'''-ジ（2-

ヒドロキシ-3-スルホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物3) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス(ピペラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)を純水45mlに溶解し60℃に加熱した。この溶液に、3-クロロ-2-ヒドロキシルホン酸ナトリウム2.95g (15.0 mmol)を純水40mlに溶解した溶液を30分間滴下した後、1.5時間で70℃まで昇温した。次に、この溶液に、水酸化ナトリウム0.6g (15.0 mmol)を純水40mlに溶解した溶液を30分間で滴下したのち、80℃で18.5時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)100mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応の3-クロロ-2-ヒドロキシルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させ、この溶出液を20mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を10mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調製した後、エタノール150mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物1.42gを得た。収率40% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.15-2.94 (m 24H) 3.02-3.06 (m 4H) 4.23-4.37 (m 2H) MS (FAB negative) $M-1=473$

実施例4

1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(カルボキシメチル)ピペラジノ)エタン(化合物4)の合成
モノブrom酢酸2.64g (19.0 mmol)を純水10mlに5~10℃で溶解した溶液に水酸化カリウム1.40g (25.0 mmol)を純水10mlに溶解した溶液を滴下し、中和した。この溶液を5℃から20℃まで昇温しながら、実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス(ピペラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)を純水30mlに溶解した溶液を、2時間で滴下した。次に、この溶液を20℃から30℃まで昇温しながら、水酸化カリウム1.24g (22.1 mmol)を純水35mlに溶解した溶液を2時間で滴下した。次に、この溶液を30℃から50℃まで2時間で昇温した後、50℃で8時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)75mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のモノブrom酢酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80mlま

で減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を60mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調製した後、イソプロピルアルコール800mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥した後、純水4mlから再結晶して、目的化合物0.89gを得た。収率38% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.54 (s 4H) 3.00 (s 20H) MS (FAB negative) $M-1=313$

実施例5

1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(2-カルボキシエチル)ピペラジノ)エタン(化合物5)の合成

実施例1<D>に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス(ピペラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)とアクリル酸ナトリウム1.69g (18.0 mmol)を純水50mlに溶解し、24時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)70mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のアクリル酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭で脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調製した後、イソプロピルアルコールを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化リン上で減圧乾燥した後、純水から再結晶して目的化合物1.33gを得た。収率52% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.36 (t $J=7.3\text{ Hz}$ 4H) 2.43-2.96 (m 24H) MS (FAB negative) $M-1=341$

同様に、メタクリル酸ナトリウムを用いて反応させ、1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(2-カルボキシプロピル)ピペラジノ)エタン(化合物6)を得た。表1にその元素分析値を示した。

実施例6

1, 6-N, N'-ビス(N', N'-ジ(2-スルホノエチル)ピペラジノ)ヘキサ(化合物7)の合成

<A> 1, 6-N, N'-ビス(N', N'-ジ(tert-ブトキシカルボニル)ピペラジノ)ヘキサンの合成

実施例1に示した合成法と同様の操作で反応した。N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン4.65g (25.0 mmol)と1, 6-ジブromヘキサン2.44g (10.0 mmol)をアセトニトリル100mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム2.94g (35.0 mmol)を加えた後、24時間、加

熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 2.90 g を得た。収率 64% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.25-1.37 (m 4H) 1.38-1.58 (m 22H) 2.28-2.39 (m 12H) 3.43 (t J=4.9 Hz 8H) MS (FAB positive) $M+1=455$

 1, 6-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) ヘキサノ (化合物 7) の合成

1, 6-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (tert-ブトキシカルボニル) ピペラジノ) ヘキサン 2.82 g (6.21 mmol) に純水 40 ml と 47% 臭化水素酸水溶液 26 g を加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、 $^1\text{H-NMR}$ で tert-ブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】実施例 10

1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物 11) の合成

<A> 1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-ヒドロキシエチル) ピペラジノ) エタンの合成
ピペラジノエタノール 15.6 g (120 mmol) と 1, 2-ジブロムエタン 9.27 g (49.3 mmol) をアセトニトリル 50 ml に溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 12.8 g (152 mmol) を加えた後、20 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣を 50 ml のクロロホルムで 4 回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 3.00 g を得た。収率 21% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 2.38-2.73 (m 24H) 3.00 (s 2H) 3.61 (t J=5.4 Hz 4H) MS (FAB positive) $M+1=287$

 1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物 11) の合成

1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-ヒドロキシエチル) ピペラジノ) エタン 2.00 g (6.99 mmol) を 20 ml のジメチルスルホキシドに溶解し、氷浴で冷却した。この溶液にクロルスルホン酸 2.04 g (17.5 mmol) を 30 ml のジメチルスルホキシドに溶解した溶液を滴下した。滴下終了後、室温で 2 時間攪拌した。攪拌終了後、氷浴で冷却しながら、純水 50 ml を滴下し、過剰のクロルスルホン酸を分解し、次に、25% アンモニア水溶液を滴下し中和した。この溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 150 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調整した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 1.06 g を得た。収率 34% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.07-2.94 (m 24H) 3.58 (t J=6.4 Hz 4H) MS (FAB negative) $M-1=445$

実施例 11

1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 2 ナトリウム塩 (化合物 12) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 3.12 g (7.54 mmol) を純水 20 ml に溶解した。この溶液を 10% 塩化ナトリウム水溶液でナトリウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 100 ml を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にエタノール 250 ml を加え、生成した沈殿をろ取し、五酸化リン上で減圧乾燥して、目的化合物 3.12 g を得た。収率 90% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $M-\text{Na}=435$

実施例 12

1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 2 アンモニウム塩 (化合物 13) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N' -ビス (N' ', N' ' ' -ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 3.21 g (7.75 mmol) を純水 20 ml に溶解した。この溶液を 10% 塩化アンモニウム水溶液でアンモニウム型とした陽イオン交換樹脂 (Do

wex 50W-X8 200~400メッシュ) 100ml
1を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にイソプロパノール250mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物3.00gを得た。収率86% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $\text{M}+1-2\text{NH}_4=413$

実施例13

化合物1、2、3及び4の滴定

化合物1、2、3及び4を1mmol秤取り、純水100mlに溶解した。溶液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、pHメーター（堀場製作所製 pHメーター F-1 pH電極6366-10D）でpHを測定しながら、0.1Nアンモニア水溶液で滴定した。0.1Nアンモニア水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。この発明の優れたpH緩衝効果が認められる。

比較例1

HEPESの滴定

実施例13に示した方法と同様な操作で滴定した。HEPESを1mmol秤取り、純水100mlに溶解し、0.1Nアンモニア水溶液で滴定した。0.1Nアンモニア水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。

実施例14

化合物1から13を用いた動物細胞培養

ハイブリドーマHB4C5細胞 (1×10^5 細胞/ml) を、HEPESを含まない極東E-RDF培地（極東製薬工業社製）にITES（インシュリン $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタノールアミン $20 \mu\text{M}$ 、亜セレン酸ナトリウム 20mM いずれも最終濃度）を添加した培地（以下、ITES-ERDF培地と略記する）に、化合物1から13を15mMの濃度となるように添加した培地で、ハイブリドーマHB4C5細胞を 37°C で5%炭酸ガスインキュベーター中で4日間培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養液を遠心分離 ($500 \times g$ 5分間) して得られた培養上清中の抗体 (IgM) 量をELISA法で定量した。その結果を次の表3に示した。